

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-277494

(43)Date of publication of application : 07.11.1989

(51)Int.Cl.

C12P 7/02
// C12N 9/04
(C12N 9/04
C12R 1:01)

(21)Application number : 63-103851

(71)Applicant : AGENCY OF IND SCIENCE &
TECHNOL

(22)Date of filing : 28.04.1988

(72)Inventor : KISE SHOICHI
HAYASHIDA MIKIO

(54) PRODUCTION OF OPTICAL ACTIVE ALCOHOL

(57)Abstract:

PURPOSE: To produce an optically active alcohol in high efficiency, with little production of by-product, by reacting a ketone compound with a 3 α - hydroxysteroid dehydrogenase (HSDH).

CONSTITUTION: HSDH is prepared by purifying an enzyme originated from Cellulomonas turbata KE31 strain. An enzyme liquid is produced by dissolving 0.01-200mg of the HSDH in 1ml of a 0.1M phosphate buffer solution having pH of 5.5-8. The enzyme liquid is added with a ketone compound (e.g. 4- chloroaceto-acetic acid ethyl ester) of an amount corresponding to 10-1,000 times the weight of the enzyme and with a reduced nicotinamide adenine dinucleotide of an amount equimolar to the ketone compound used as a raw material and optionally Tween 80, etc., and the components are made to react at 15-40°C for 1hr-7 days under agitation. The progress of the reaction is traced by gas chromatography and the reaction is terminated when the raw material is disappeared. The obtained reaction liquid is subjected to centrifugal separation, extraction and purification to recover an optically active alcohol.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of

rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

DERWENT-ACC-NO: 1989-368601

DERWENT-WEEK: 198950

COPYRIGHT 2005 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Optically active alcohol(s) prodn - by
converting ketone
cpds. using 3 alpha hydroxy:steroid
de:hydrogenase

PATENT-ASSIGNEE: AGENCY OF IND SCI & TECHNOLOGY [AGEN]

PRIORITY-DATA: 1988JP-0103851 (April 28, 1988)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE
PAGES MAIN-IPC		
JP 01277494 A	November 7, 1989	N/A
004 N/A		
JP 92005436 B	January 31, 1992	N/A
000 N/A		

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO
APPL-DATE		
JP 01277494A	N/A	1988JP-0103851
April 28, 1988		
JP 92005436B	N/A	1988JP-0103851
April 28, 1988		

INT-CL (IPC): C12N009/04, C12P007/02 , C12R001/01

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 01277494A

BASIC-ABSTRACT:

Optically active alcohols are produced by converting ketone cpds. by means of 3 alpha -hydroxysteroid dehydrogenase, eg. the enzyme obtd. from the Celluromous genus.

USE/ADVANTAGE - Optically active alcohols are useful as intermediates for the synthesis of pharmaceuticals, agrochemicals or physiologically active substances and for strong dielectric materials, e.g. D-carnitin, a deriv. of

4-chloro-3(S) hydroxybutanic acid ethyl ester, has physiological activity which antagonistically inhibits carnitin acetyltransferase. R-(-)-2-octanol and 2-methyl-4(S)-hydroxypentane are used for strong dielectric materials. The alcohols are produced by fermentation effectively, with little by-products. Pref. 3 alpha-hydroxysteroid - dehydrogenase (3 alpha -HSDH) is pref. obtd. from cellulomonas turubata KE 31 strain (FERM P-9059).

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

TITLE-TERMS: OPTICAL ACTIVE ALCOHOL PRODUCE CONVERT KETONE COMPOUND ALPHA

HYDROXY STEROID DE HYDROGENASE

DERWENT-CLASS: B05 C03 D16 E19

CPI-CODES: B10-E04; C10-E04; D05-C; E10-E04D; E10-E04E; E10-E04F;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M2 *01*

Fragmentation Code

H4 H401 H481 H602 H681 H8 J011 J271 M210 M212
M216 M220 M222 M232 M272 M281 M313 M320 M321 M332
M343 M362 M391 M416 M620 M720 M800 M903 M904 N134
N243 N342 N362 N425 N460 N512 P616 Q233 V812

Markush Compounds

198950-21601-P

Registry Numbers

1704X 1724X 1711X 1714X 89290 1327U 0502U

Chemical Indexing M3 *02*

Fragmentation Code

H4 H401 H481 H602 H681 H8 J011 J271 M210 M212
M216 M220 M222 M232 M272 M281 M313 M320 M321 M332
M343 M362 M391 M416 M620 M720 M800 M903 M904 N134
N243 N342 N362 N425 N460 N512 P616 Q233

Markush Compounds

198950-21601-P

Registry Numbers

1704X 1724X 1711X 1714X 89290 1327U 0502U

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1989-163419

⑫ 公開特許公報(A) 平1-277494

⑤ Int. Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 平成1年(1989)11月7日
 C 12 P 7/02 6926-4B
 // C 12 N 9/04 Z-7823-4B
 (C 12 N 9/04
 C 12 R 1:01) 審査請求 有 請求項の数 2 (全4頁)

⑭ 発明の名称 光学活性アルコールの製造方法

⑯ 特 願 昭63-103851

⑰ 出 願 昭63(1988)4月28日

⑱ 発 明 者 木 瀬 昇 一 山口県玖珂郡和木町和木6丁目1番2号 三井石油化学工業株式会社内

⑲ 発 明 者 林 田 幹 夫 山口県玖珂郡和木町和木6丁目1番2号 三井石油化学工業株式会社内

⑳ 出 願 人 工業技術院長 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

明 細 書

1. 発明の名称

光学活性アルコールの製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) 3 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素を用いて、ケトン化合物を光学活性アルコールに変換することを特徴とする光学活性アルコールの製造方法。

(2) 3 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素がセルロモナス属由来の酵素である請求項1記載の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は3 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素を作用させることを特徴とする光学活性アルコールの新規な製造方法に関するものである。

〔従来の技術〕

光学活性アルコールは医薬、農薬、生理活性物質の合成中間体および強誘電性材料に用いられている。たとえば4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブ

タン酸エチルの誘導体であるD-カルニチンはカルニチンアセチルトランスフェラーゼを拮抗的に阻害するような生理活性を有する。また光学活性なR-(-)-2-オクタノールや2-メチル-4(S)-ヒドロキシペンタンは強誘電性材料の素材に用いることができる。

従来、ケトン化合物を光学活性なアルコールに変換する方法としては、化学触媒を用いる方法、あるいは生体触媒を用いる方法が知られている。化学触媒を用いる方法はNaBH₄やLiAlH₄を用いて還元した場合、光学収率が非常に低くラセミ体ができる。すなわちこのラセミ体を酒石酸やD-マンデル酸のような光学分割剤を用いて光学分割したのち、光学活性なアルコールを得るという繁雑なステップを踏まざるを得ない。また最近では光学活性な配位子を持ったキラル触媒を用いて光学活性なアルコールを得ようと試みられているが、極低温で反応する必要のあることやキラル触媒が高価でかつ再生が困難であることが問題となっている。

一方、微生物、植物、動物などの生体触媒を用いる方法は、一般に光学収率が高いという利点を有する。たとえば4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルは「アニュアル・ニューヨーク・アカデミック・サイエンス 434巻、186-193(1984)」に記載されているように、種々の微生物によって発酵生産されることが明らかになっている。

〔発明が解決しようとする課題〕

このように化学触媒を用いて光学活性なアルコールを合成するのは、現在のところ技術的に困難な問題が横たわっている。一方、微生物による発酵生産の方法では原料あるいは生産物による菌体の成育阻害が起こるため、原料を多く仕込めないという問題点がある。また発酵液から生産物を採取する際、副産物を除去しなければならないなど精製に手間がかかるという問題点がある。

本発明の目的は、このような問題点を解決し、副産物が少なく、効率よく光学活性アルコールを製造する方法を提供することである。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者らは微生物由来の酵素を用いて、光学活性なアルコールを製造する方法を鋭意検討した結果、3 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素を用いれば効率よくケトン化合物を光学活性なアルコールに変換することを見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明は3 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素を用いて、ケトン化合物を光学活性アルコールに変換することを特徴とする光学活性アルコールの製造方法である。

本発明に使用する3 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素（以後3 α -HSDHと略す）は、セルロモナス・ツルバタKE31株（微工研菌寄第9059号）由来のものが好ましいが、これに限定されない。この酵素は、特願昭62-69598号に記載されている精製法によって純品のものが得られる。この純品の酵素はもちろん使用することができるが、硫酸分画あるいはDEAE-セファロースクロマトグラフィーで得られる半精製品も使うことができる。このような酵素を用いて光学活性なアルコールを製

3

造するにあたり、例えば精製酵素0.01~200mgをpH5.5~8.0、好ましくはpH6.5~7.5の0.1Mリン酸緩衝液1mlにとかし、原料のケトン化合物（例えば4-クロロアセト酢酸エチル、2-オクタノン、メチルイソブチルケトンなど）および原料と等モルの還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NADH）を添加する。この反応では、添加したNADHは酸化されてニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）になるため、生産物と等モルのNADHを加える必要がある。しかし、高価なNADHを有効に利用するためには、NADをNADHにするような酵素、例えばグルコース脱水素酵素（以下GDHと略す、アマノ製薬社製）や耐熱性のグルコース-6-リン酸脱水素酵素（ユニチカ社製）、蟻酸脱水素酵素（天野製薬社、ベーリンガー社、メルク社製など）、あるいは3 α -HSDH（KE31株由来精製酵素やシグマ社製）などを共存させれば原料の1/10~1/10,000モルのNAD（H）を添加するだけで反応させることもできる。ケトン化合物の添加量は、

5

4

その種類によって異なるが、酵素重量の約10~100倍である。これらを加えて、15~40℃、好ましくは25~35℃で1時間から1週間攪拌しながら反応を行う。反応液にアエロゾルOTやツィーン80などの界面活性剤を添加した場合、より効率良く反応させることができる。またDEAE-セファロースやデュオライトA561のようなイオン交換樹脂を反応系に加えることによって、反応速度を向上させたり酵素を安定に保ちながら反応を続けることもできる。反応の経時変化をガスクロマトグラフィー（PEG20Mキャピラリーカラム、25m, 50→150℃, 10℃/minで昇温分析）で追跡し、原料がほぼ失くなった時点で反応を止め、遠心分離することによって、水層を分け生成物を採取する。回収率を高めるためには水中に溶けている生産物を酢酸エチル、ヘキサン、ジエチルエーテル、1,2-ジクロロエタン、クロロホルムなどの溶媒を用いて抽出する。精製品が必要であれば、これらの生産物を蒸留等によって精製し、目的の光学活性なアルコールを得ることができる。

6

〔実施例〕

実施例 1. 光学活性 4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルの製法

0.2M NaCl を含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 18ml に 1.5g (8.33 ミリモル) のグルコース、7mg の 3 α -HSDH (KE31 株由来の精製酵素、20U/mg 蛋白)、NADH 再生用酵素として 2.5mg の GDH (40U/mg 蛋白) および 191mg (0.25 ミリモル) の NADH を溶かし、これに 1.2g (7.29 ミリモル) の 4-クロロアセト酢酸エチルを添加して良く攪拌しながら 20℃ で反応した。反応が進むにつれて pH が低下するので、1M の Na₂CO₃ で pH を 7.0 に調整し反応を続けた。3.5 時間反応後、反応液に酢酸エチル (20ml \times 2 回) を加えて生成物を抽出した。抽出液に Na₂SO₄ を入れて水分を除去した後、さらにモルキュラーシープを加えて乾燥した。標品に混在する酢酸エチルを減圧下で除去し、750mg (4.5 ミリモル) の 4-クロロ-3-ヒドロキシブタン酸エチルを得た。これを 3,5-ジニトロフェニルイソシアネート (以下 DNPI と略す) で誘

導体化したあと液体クロマトグラフィー (カラム: OA-2100, 住友化学製、溶媒: ヘキサン/クロロホルム/エタノール=50/15/1、流速 1 ml/min) によって分析した。上述の酵素反応によって生成した 3-ヒドロキシ体中には 99.1% の 4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルと 0.9% の 4-クロロ-3(R)-ヒドロキシブタン酸エチルが含まれており、3(S)-ヒドロキシ体が優先的に生成した。4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルの収率は 62% であった。

実施例 2. 光学活性 4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルの製法

NADH 再生用酵素として 3 α -HSDH (実施例 1 と同様の精製酵素)、NADH 再生用基質としてメチルイソブチルカルビノールを用いた。25 μ l の 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に 2.33mg の 3 α -HSDH および 25 μ l の 5mM NADH (0.125 μ モル) を加えて溶解し、260 μ l のメチルイソブチルカルビノールおよび 40 μ l (295 μ モル) の 4-クロロアセト酢酸エチルを加えて攪拌しながら 30℃ で

7

反応した。反応開始後 6 時間目には 40 μ l の 4-クロロアセト酢酸エチル、21 時間目には 40 μ l の 4-クロロアセト酢酸エチルおよび 260 μ l のメチルイソブチルカルビノール、10 μ l のリン酸緩衝液を加えて、さらに 60 時間反応を続けた (総反応時間は 81 時間)。反応終了後、ガスクロマトグラフで分析した結果、810 μ モルの 3-ヒドロキシ体が生成していた。この溶液に混在するメチルイソブチルカルビノール、メチルイソブチルケトン を減圧下 40℃ で除去したあと、旋光度の測定及び液体クロマトグラフによって異性体純度の測定を行った。クロロホルムに溶かした場合の比旋光度は $[\alpha]_D^{25} = -20.63^{\circ}$ であり 4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルが優先的に生成していた。また DNPI で誘導体化した標品を液体クロマトグラフで分析した結果、99% の 4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルと 1% の 4-クロロ-3(R)-ヒドロキシブタン酸エチルが生成していた。4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルの収率は 91% であった。

9

8

実施例 3. 光学活性 4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルの製法

酵素の反応速度および安定性を高めるために 70mg の膨潤状態の DEAE-セファロースを添加して、実施例 2 と同様にして反応を行なった。反応終了液をガスクロ分析したところ 860 μ モルの 3-ヒドロキシ体が生成していた。またメチルイソブチルカルビノール、メチルイソブチルケトン を除去したあと、旋光度の測定および液体クロマトグラフによって異性体純度の測定を行った。クロロホルム中における比旋光度は $[\alpha]_D^{25} = -20.71^{\circ}$ であり 4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルが優先的に生成していた。また DNPI 誘導体を液体クロマトグラフで分析した結果、99.2% の 4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルと 0.8% の 4-クロロ-3(R)-ヒドロキシブタン酸エチルが生成していた。4-クロロ-3(S)-ヒドロキシブタン酸エチルの収率は 97% であった。

実施例 4. 光学活性 R-(-)-2-オクタノールの製法

10

0.2M NaCl を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.0) 1 mlに0.51g(2.83ミリモル)のグルコース、1 mgの3 α -HSDH (K31株由来の精製酵素、2.6 mgのGDHおよび10mgのNADH (13 μ モル)を溶かし、これに0.1 ml(82mg, 640 μ モル)の2-オクタノンを添加して25℃で反応を行った。反応と共にpHは低下するので絶えずスターラーで攪拌し、1MのNa₂CO₃でpH 7.0に調整しながら反応させた。15時間反応後(途中6時間目に1 mgのGDHおよび6 mgのNADHをさらに添加した)、反応液に1,2-ジクロロエタン(1.5ml×2回)を加えて生産物を抽出した。遠心分離後1,2-ジクロロエタン層(油層)を回収し、ガスクロマトグラフを用いて分析した。油層中には64mg(490 μ モル)の2-オクタノールが生成していた。この標品の旋光度を測定したところ、比旋光度 $[\alpha]_D^{25} = -6.7 \text{ deg}$ でありR体が優先的に生成していた。一方、純品のR-(-)-2-オクタノールの比旋光度は $[\alpha]_D^{25} = -9.745 \text{ deg}$ であった。次に前述の油層に1.6 gのNa₂SO₄を加えて1夜、攪拌し

たのち0.3 ml採取してモルキュラシーブを入れてさらに1夜放置した。この液に3 mgのDNPIを加えてよく攪拌し、さらに30 μ lの乾燥ピリジンを加えて攪拌したのち4時間放置した。この誘導体を液体クロマトグラフィーで分析したところ、生成した2-オクタノールのうち84.5%はR-(-)-2-オクタノールであり、15.5%はS-(+)-2-オクタノールであった。R-(-)-2-オクタノールの収率は67%であった。

実施例 5. 光学活性 2-メチル-4(S)-ヒドロキシベンタンの製法

0.1M NaCl を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.0) 2.8 mlに1.99g(11.1ミリモル)のグルコース、2.6 mgの3 α -HSDH (K31E株由来精製酵素)、2.7 mgのGDHおよび20mgのNADH (26 μ モル)を溶かし、これに0.6 ml(480mg, 4.97ミリモル)のメチルイソブチルケトンを添加してpH 7.0に調整しながら25℃で反応を行なった。15時間反応後(途中6時間目に2 mgのGDHおよび12mgのNADHをさらに添加した)、反応液に1,2-ジクロ

1 1

1 2

ロエタン(2.5 ml×2回)を加えて抽出し、遠心分離して1,2-ジクロロエタン層(油層)を回収した。これをガスクロマトグラフで分析したところ215mgのメチルイソブチルカルビノールが生成していた。この標品の旋光度を測定したところ、比旋光度 $[\alpha]_D^{25} = +0.127 \text{ deg}$ であった。またDNPIで誘導体化した後、液体クロマトグラフによって、異性体の純度を測定した結果、2-メチル-4(S)-ヒドロキシベンタンは62.4%、2-メチル-4(R)-ヒドロキシベンタンは37.6%含まれており、4(S)-ヒドロキシ体が優先的に生成していた。2-メチル-4(S)-ヒドロキシベンタンの収率は27.8%であった。

(発明の効果)

本発明方法によれば、副産物が少なく効率よく、光学活性アルコールを製造することができる。

出願人 工業技術院長

1 3